

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-146187

(43)Date of publication of application : 02.06.1998

(51)Int.Cl. C12N 1/20
A01G 7/00
A01N 63/00
A01N 63/02
C05F 11/08
C05G 1/00
C05G 3/02
C05G 5/00
// (C12N 1/20
C12R 1:07)

(21)Application number : 08-306855 (71)Applicant : ASADA SHOJI KK

(22)Date of filing : 18.11.1996 (72)Inventor : SHIGEMITSU SHUNYO

(54) LIQUID COMPOUND FERTILIZER INHIBITING GENERATION OF PLANT DISEASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new heat-resistant microorganism comprising heat-resistant *Bacillus amyloliquefaciens* capable of being proliferated at a specific temperature or higher, capable for producing cultured products enabling to inhibit the generation of plant diseases, and useful for liquid compound fertilizers, etc., from an animal organic fertilizer.

SOLUTION: Heat-resistant *Bacillus amyloliquefaciens* (FERM P-15796) capable of being proliferated at temperatures of $\geq 50^{\circ}$ C. The microorganism can produce cultured products capable of inhibiting the generation of plant diseases. The cultured products can be used as liquid compound fertilizers, leaf surface-applying liquids, etc., to inhibit the generation of the plant diseases caused by microorganisms such as *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* or *Verticillium* and healthily grow the plants. The heat-resistant microorganisms are obtained by gathering a fermenting animal organic fertilizer having a fermentation temperature of 70° C, suitably diluting the organic fertilizer with sterilized water, culturing microorganisms contained in the diluted fertilizer at $50-60^{\circ}$ C by a plate dilution method, screening the culture product and subsequently collecting the produced colony.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.11.2003

[Date of sending the examiner's decision]

of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-146187

(43) 公開日 平成10年(1998) 6 月 2 日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20 E
A 0 1 G 7/00	6 0 5	A 0 1 G 7/00 6 0 5 Z
A 0 1 N 63/00		A 0 1 N 63/00 F
63/02		63/02 E
C 0 5 F 11/08		C 0 5 F 11/08

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-306855	(71) 出願人	596166302 浅田商事株式会社 東京都中野区本町 2 丁目46番 1 号
(22) 出願日	平成 8 年(1996)11月18日	(72) 発明者	重光 春洋 愛知県名古屋市中川区水里 5 丁目565番地
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 植物病害の発生を抑制する液体複合肥料

(57) 【要約】

【解決手段】 動物有機肥料から得た耐熱性のバチルス・アマイロリケファセンス、この培養物および／または菌体含有液を含む液体複合肥料、これらを含有する葉面散布液を提供する。

【効果】 動物有機肥料から得た耐熱性のバチルス・アマイロリケファセンスの培養物および／または菌体含有液を含む液体複合肥料を使用すると、従来防除が困難とされていたフザリウム菌、リゾクトニア菌、ビシウム菌、パーティシリウム菌などの菌によって発生する植物病害の発生を抑制しつつ、植物を健全に育成することができる。また、葉面散布液として使用した場合にも、病害の発生を抑制することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 50℃以上で増殖可能な耐熱性バチルス・アマイロリケファセンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

【請求項2】 請求項1に記載の耐熱性バチルス・アマイロリケファセンスの培養物および／または菌体を含むことを特徴とする液体複合肥料。

【請求項3】 前記液体複合肥料が、1～5重量%の硝酸態窒素または1～5重量%のアンモニア態窒素をさらに含むことを特徴とする請求項2に記載の液体複合肥料。

【請求項4】 前記硝酸態窒素が、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、硝酸マグネシウム、および硝酸マンガンからなる群から選ばれる1種以上からなるものであることを特徴とする請求項2に記載の液体複合肥料。

【請求項5】 前記アンモニア態窒素が、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸1アンモニウム、リン酸2アンモニウム、および尿素からなる群から選ばれる1種以上からなるものであることを特徴とする請求項2～4のいずれかに記載の液体複合肥料。

【請求項6】 5～10重量%のカリおよび／または4～8%のリン酸をさらに含むことを特徴とする請求項2～5のいずれかに記載の液体複合肥料。

【請求項7】 請求項1に記載の耐熱性バチルス・アマイロリケファセンスの培養物および／または菌体を含むことを特徴とする葉面散布液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物病害の発生を抑える培養物を産生する新規な耐熱性バチルス菌、およびその利用に関する。より詳細には、上記バチルス菌の培養物および／または菌体含有液を含む液体複合肥料、またはこれらを含有する葉面散布液に関し、植物病害の中でも、防除することが難しいといわれているフザリウム (*Fusarium*) 菌、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 菌、ビシウム (*Pythium*) 菌、バーティシリウム (*Verticillium*) 菌、オフィオボラス (*Ophiobolus*) 菌および／またはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 菌によって引き起こされる病害の発生を抑え、植物体を健全に育成することができる液体複合肥料に関する。

【0002】

【従来の技術】農作物および園芸作物は、露地栽培、ハウスの通常(土壌)栽培、水耕栽培、礫耕栽培、ロックウール栽培等の種々の方法で栽培されている。上記病原菌が栽培されている植物に感染すると、キュウリつる割病、キュウリ苗立枯病、オフィオボラスパッチ病、または水耕栽培の際に生じる立枯病などの農作物および園芸作物の病害を引き起こされる。

【0003】こうした病害を防除するために、幾つかの

防除手段が採られている。土壌栽培の場合には、土壌表層部に対しては、TPN、キャプタン、エクロメゾール、メタラキシル、メプロニル、PCNB剤などの薬剤を用いた消毒が行なわれている。また、土壌深層部に対しては、臭化メチル、クロルビクリン酸を用いる土壌の消毒が行われている。

【0004】一方、水耕栽培、礫耕栽培、およびロックウール栽培では、ホルマリンまたは次亜塩素酸ナトリウムによる装置の消毒あるいはエクロメゾールまたはTPN剤の培養液への混入が試みられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、土壌消毒剤の臭化メチルは土壌中から揮発した後はオゾン層を破壊するため使用は避けるべきであり、また、21世紀には製造が全面禁止されることが決まっている。クロルビクリン酸は劇薬であるために注意深く取扱う必要があり、さらに刺激臭が強く、作業が非常にやりにくいという問題点がある。他の農薬にはこれらのような問題点はないものの、農薬を栽培液に混入して農作物を栽培すると、農作物の体内に農薬が蓄積して残留するという問題がある。一方で、一定の収穫量と品質の農作物を確保するためには、農薬を使用せざるを得ない。

【0006】また、農作物を育成させるためには、固形肥料、液体肥料、複合肥料など各種の肥料が使用されている。現在のところ、農業および園芸において灌水と同時に植物体に施用することができるという理由から、液体複合肥料が広く普及しているが、こうした肥料はいずれも植物の育成に重点が置かれたものとなっており、上記のような植物病害を防除する作用を有するものは知られていない。

【0007】さらに、植物土壌病害の発生が、土壌中の窒素の形態によって影響されるということがヒューバーおよびワトソンによって報告されている(D. M. Huber and R. D. Watson, *Annu. Rev. Phytopath.* 12:139-165 (1974))。彼らは、この報告の中で、窒素の形態が寄主の抵抗性、病原菌の活動、およびこれらの双方に影響を及ぼす可能性があるとして述べている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の発明者らは、以上のような問題点を解決するために鋭意研究を進めた結果、動物肥料由来の耐熱性バチルス菌が上述のような病原菌によって引き起こされる病害を防除できる物質を産生することを見出し、本発明を完成したものである。さらに、本発明の発明者らは、植物病原菌と土壌中の窒素の形態との関係を様々な面から検討した結果、硝酸態窒素がフザリウム (*Fusarium*) 菌およびリゾクトニア (*Rhizoctonia*) 菌によって引き起こされる病害を減少させること、およびアンモニア態窒素がビシウム (*Pythium*) 菌、バーティシリウム (*Verticillium*) 菌、オフィオボラス (*Ophiobolus*) 菌、およびストレプトマイセス

(Streptomyces) 菌によって引き起こされる病害を減少させることを見出し、本発明を完成したものである。

【0009】すなわち、本発明の第一の態様は、50℃以上で増殖可能な耐熱性バチルス・アマイロリケファセンス(Bacillus amyloliquefaciens)である。上記バチルス・アマイロリケファセンスは、フザリウム菌、リゾクトニア菌、ピシウム菌、パーティシリウム菌、オフィオボラス菌、およびストレプトマイセス菌からなる群から選ばれる菌に拮抗可能な培養物を生産することができる。

【0010】本発明の第二の態様は、上記耐熱性バチルス・アマイロリケファセンスの培養物および／または菌体を含むことを特徴とする液体複合肥料である。上記液体複合肥料は、1～5重量%の硝酸態窒素または1～5重量%のアンモニア態窒素をさらに含むことを特徴とする。

【0011】また、上記硝酸態窒素は、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、硝酸マグネシウム、および硝酸マンガからなる群から選ばれる1種以上からなるものであることを特徴とする。上記アンモニア態窒素は、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸1アンモニウム、リン酸2アンモニウム、および尿素からなる群から選ばれる1種以上からなるものであることを特徴とする。さらに、上記液体複合肥料は、5～10重量%のカリおよび／または4～8%のリン酸をさらに含むことを特徴とする。

【0012】本発明の第三の態様は、上記耐熱性バチルス・アマイロリケファセンスの培養物および／または菌体を含むことを特徴とする葉面散布液である。上記葉面散布液は、1～5重量%の硝酸態窒素または1～5重量%のアンモニア態窒素をさらに含むことが好ましく、こ

こに含まれる硝酸態窒素およびアンモニア態窒素は、上記液体複合肥料に含有されるものと同じ化合物から選ばれる。さらに、上記葉面散布液体は、5～10重量%のカリおよび／または4～8%のリン酸をさらに含むことを特徴とする。これらも、上記液体複合肥料に含まれるものと同じ化合物群から選ばれる。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の植物病害の発生を抑制する液体複合肥料について詳述する。

10 【0014】本発明の上記耐熱性バチルスは、動物有機肥料から得られたものである。すなわち、発酵温度が70℃の発酵過程中的動物有機肥料を採取し、殺菌水で適宜希釈し、平板希釈法で微生物をスクリーニングして得たものである。スクリーニングは以下に行なう。

【0015】まず、シャーレにPDA培地をいれて作製した平板培地に、コンラージ棒などを使用して上記の希釈液を塗布する。耐熱性のバチルスを採取するために、通常、菌を培養する温度より高い温度で培養した。培養温度は、50～65℃で行なうことが耐熱性の菌のみをスクリーニングする上で好ましく、55℃とすることが、寒天培地が速やかに乾燥しないためにさらに好適である。

20 【0016】平板寒天上に現われたコロニーを、予め試験管内にPDA培地を入れて作製しておいた斜面培地に移植して単離し、再び平板希釈法のときと同じ温度で培養する。55℃で培養すると、寒天培地が速やかに乾燥しない点で好適である。

【0017】このようにして単離された菌について調べた菌学的性質を、表1に示す。

【0018】

30 【表1】

1. 形態学的性質	
細胞の大きさ	0.7 ~ 0.8 × 1.5 ~ 1.8 μm
胞子の有無	有芽胞
2. 培養的性質 (ニュートリエント培地での培養状態)	
コロニーの形態	ラフ (rough)
色	クリーム色または茶色
光沢	-
3. 生理学的性質	
酸素に対する態度	好氣的
グラム染色性	+
溶血性	β溶血
グルコースからの生成物	
酸	+
ガス	-
アセトン (VP)	+
炭水化物からの酸	
ガラクトース	-
マンノース	-
ラフィノース	+
キシロース	+
ONPG	+
クエン酸の利用	+
ウレアーゼ	-
デンプンの加水分解	+
オキシターゼ	-
エスクリン	+
硝酸塩の還元	+

【0019】以上より、上記の菌は、バチルス・アマイロリケファセンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) と判明した。この菌は、工業技術院生命工学生命技術研究所に1996年8月21日に寄託されている (FERM P-15796)。次いで、この菌を以下に示す植物病害の原因菌と対峙培養して、これらの菌に対する拮抗力を検討する。

【0020】フザリウム (*Fusarium*) 菌は不完全菌であるフザリウム属の菌の総称であり、代表的な菌としては、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、フザリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*) およびフザリウム・ラテリチウム (*Fusarium lateritium*) などを挙げることができ、ダイズ、アズキ、エンドウ、キュウリ、トマト、キャベツ、イチゴなどの植物において立枯病、つる割病、萎ちょう病、萎黄病を引き起こす。立枯病とは、作物の根および地際部あるいは維管束、特に導管部が病原菌の寄生を受けて、組織の壊死、崩壊を起こすために、地上部への水分や養分の供給ができなくなり、地上部が黄化、萎ちょうし後に枯死する病気である。

【0021】リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 菌は、リゾクトニア属の菌の総称であり、代表的な菌としては、リゾクトニア・バタチコラ (*Rhizoctonia bataticola*)、リゾクトニア・レグミニコラ (*Rhizoctonia leguminicola*)、リゾクトニア・オリザエ (*Rhizoctonia oryzae*)、リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)、およびリゾクトニア・ツリバラム (*Rhizoctonia tulipa*)

rum)、リゾクトニア・フラガリア (*Rhizoctonia fragariae*)、およびリゾクトニア・セデアリス (*Rhizoctonia cerealis*) などを挙げることができる。これらの菌もまた、トマト、ナス、ピーマン、キュウリ、ゴマ、ミツバ、チョウセンニンジンなどの植物において、出芽前立枯れや、立枯病の原因となる。出芽前立枯れとは、播種後幼芽が地表面に出る前に腐敗枯死することをいう。

【0022】ビシウム (*Pythium*) 菌は、鞭毛菌類ツスカビ目の *Pythium* 属の菌の総称であり、代表的な菌としては、ビシウム・アフアニデルマタム (*Pythium aphanidermatum*)、ビシウム・ククビタセアラム (*Pythium cucurbitacearum*)、ビシウム・デバリヤナム (*Pythium debaryanum*)、ビシウム・グラミニコラム (*Pythium graminicolum*)、ビシウム・ホリノウチエンシス (*Pythium horinouchiensis*)、ビシウム・イワヤマイ (*Pythium iwayamai*)、ビシウム・パディカム (*Pythium paddicum*)、ビシウム・イレギュラエ (*Pythium irregulare*)、ビシウム・スピノサム (*Pythium spinosum*) などを挙げることができる。これらの菌は、アスター、ホウレンソウ、トロロアオイなどの植物において、立枯病、苗立枯病、苗腐病などの原因となる。

【0023】バーティシリウム (*Verticillium*) 菌は、バーティシリウム属の菌の総称であり、代表的な菌としては、バーティシリウム・アルボアトラム (*Verticillium albo-atrum*)、バーティシリウム・ダリアエ (*Verticillium daliae*) などがある。これらは、ジャガイ

モ、ダイズ、トマト、ナスなどの植物において、半身萎ちょう病、萎ちょう病などの病気を引き起こす。

【0024】オフィオボラス (*Ophiobolus*) 菌は、子嚢菌体類であるオフィオボラス属の菌の総称であり、オフィオボラス・グラミニス (*Ophiobolus graminis*) などを挙げることができる。これらの菌は、コムギ、オオムギ、イネなどの植物において立枯病を引き起こす。

【0025】ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 菌は、ストレプトマイセス属に属する放線菌の総称であり、代表的な菌としては、ストレプトマイセス・オーレウス (*Streptomyces aureus*)、ストレプトマイセス・グラウセセンス (*Streptomyces glaucescens*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、およびストレプトマイセス・スカビエス (*Streptomyces scabies*) などを挙げることができる。これらの菌は、ジャガイモの瘡痂病などを引き起こす。本発明のパチルス菌が、このような菌に対して拮抗力を有するか否かを以下のような対峙培養で検討する。

【0026】対峙培養は、シャーレ内の平面培地に上に乗せ、2種の菌を同時に接種して培養することを行う。この培養法を用いることによって、2種の菌が相互に相手の成長に対していかなる影響を示すか、抗菌的な反応があるかどうかを調べる場合になどに用いられる。

【0027】本発明のパチルス菌と、上記の植物病害の病原菌とを、一般的に使用される平面培地上に同時に接種し、一般的な培養条件の下で培養を行う。対峙培養していない病原菌を対照として、同様に培養する。所定の期間、培養した後に、上記の病原菌の菌糸の生育状況を、対照のシャーレと対峙培養したシャーレとで比較する。対峙培養には、本発明のパチルスの菌体およびその培養物の両方を用いることができる。

【0028】例えば、菌体を用いる場合には、本発明のパチルスを細菌の培養に一般的に使用されている液体培地にて適当な温度で培養する。このような培地としては、ニュートリエント培地、酵母エキス・アルブミン、酵母エキス・マンニットなどを挙げることができる。培養は、30〜37℃程度、好ましくは35℃付近の温度で、2〜3日間程度行なうことが、本菌の生育上好適である。例えば、ニュートリエント培地中にて、35℃で3日間、本発明のパチルスを振とう培養すると、 $1 \sim 5 \times 10^9$ cfu/mL の菌量の培養物を得ることができる。

【0029】この菌体を含む培養物を遠心して集菌し、得られた菌に適宜殺菌水を加えて所望の菌量を含む菌体含有液を得ることができる。例えば、5,000rpmで10分間遠心し、上記の培養物から菌を集める。得られた菌に適宜殺菌水を加えて、 $4 \sim 4.8 \times 10^9$ cfu/mL の菌体含有液とすることができる。ここで、cfuは、コロニー形成単位 (colony-forming unit) の略号である。

【0030】培養物を用いて病原菌に対する拮抗力を調べるためには、本発明の耐熱性パチルスを、細菌の培養

に一般的に使用されている液体培地で、適当な温度で培養する。このような培地としては、ニュートリエント培地、酵母エキス・アルブミン、酵母エキス・マンニットなどを挙げることができる。培養は、30〜37℃程度、好ましくは35℃付近の温度で、2〜3日間程度行なうことが、本菌の生育上好適である。例えば、ニュートリエント培地中にて、35℃で3日間、本発明のパチルスを振とう培養すると、 $1 \sim 5 \times 10^9$ cfu/mL の菌量の培養物を得ることができる。

【0031】この菌体含有液または培養物を、適当な大きさのディスクに所定量浸透させる。予め培養しておいた上記の病原菌を平面培地上の一方の端寄りに植え、同じシャーレの反対の端寄りに上記のディスクを置く。所定の条件の下で培養し、形成される阻止帯または阻止円の大きさで、これらの菌体含有液または培養物の拮抗力の強さを評価する。

【0032】例えば、0.2 mLの菌体含有液または培養物を直径8mmのろ紙ディスクに浸透させる。予め平面培地で培養しておいたリゾクトニア・ソラニを寒天ごと、内径6mmのコルクボーラーで打ち抜き、これをPDA培地を入れたシャーレ上に置く。同じシャーレ内に、上記のディスクを置き、25℃付近で10日程度培養し、形成された阻止帯または阻止円の大きさを測定する。対照のシャーレで形成された阻止帯または阻止円の大きさと比較して阻止率を調べる。

【0033】この結果、本発明のパチルス菌は、上述の植物病原菌に対して強い拮抗力を示す (表2)。さらに、この菌体は、上述の植物病原菌の個体群 (population) を減らし、また、これらの孢子発芽を抑制することをはっきりと示した。

【0034】上記のようにして得られた本発明のパチルス菌の培養物および/または菌体含有液に、硝酸態窒素および/またはアンモニア態窒素を添加することにより、上述の植物病害を予防可能な液体複合肥料を得ることができる。上記液体複合肥料における上記硝酸態窒素またはアンモニア態窒素の含有量は、1重量%未満では植物の生育に必要な成分が不足であり、5重量%を超えると液体複合肥料中で沈殿が生じるため、1〜5重量%とすることが好ましい。植物の生育と液体複合肥料製品の状態から、2〜4重量%であることが、さらに好ましい。

【0035】硝酸態窒素とは、各種の硝酸塩中に含まれる窒素をいい、具体的には、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、硝酸マグネシウム、および硝酸マンガンなどを挙げることができる。硝酸カリウムおよび硝酸カルシウムを使用することが、カリウムとカルシウムとを硝酸態窒素とともに補給できる点からさらに好ましい。

【0036】アンモニア態窒素とは、各種のアンモニア塩中に含まれる窒素をいい、具体的には、硫酸アンモニ

ウム、塩化アンモニウム、リン酸1アンモニウム、リン酸2アンモニウムなどのリン酸アンモニウム、および尿素を挙げることができる。リン酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムを使用することが、塩素およびリン酸をアンモニア態窒素とともに補給できる点からさらに好ましい。

【0037】上記の液体複合肥料は、さらに、5～10重量%のカリおよび/または4～8%のリン酸をさらに含んでもよい。カリの含有量が5重量%未満では植物を健全に育成するにはやや不足であり、また、10重量%を超えると過剰となる。この含有量でカリを含有させるためには、硫酸カリウム、塩化カリウム、硝酸カリウムなどのカリウムを含む化合物を添加する。窒素およびリン酸の成分を含まないため、硫酸カリウムおよび塩化カリウムを添加することが好ましい。

【0038】リン酸の含有量が5重量%未満では植物の生育に必要なリン酸肥料がやや不足であり、また、10重量%を超えると過剰となる。また、リン酸を含有させるためには、リン酸1アンモニウム、リン酸2アンモニウム、リン酸2カリウムなどのリン酸化合物を添加してもよく、また、上記のリン酸アンモニウムを添加する場合には、この添加量によって、リン酸含有量が5～10重量%となるように調整する。

【0039】上記の窒素、カリ、リン酸成分は、上述した化合物それぞれを所定量となるように添加してもよく、市販されている窒素肥料、カリ肥料、リン酸肥料などを用いて同様に添加してもよい。

【0040】本発明の液体複合肥料は、上述のようにして得た培養物および/または菌体含有液100重量部に、硝酸態窒素またはアンモニア態窒素の含量が5～10重量%となるように、上記の含窒素化合物の中から1種以上を選び、所定の量で溶解させて調整する。所望により、カリおよび/またはリン酸含量が5～10重量%となるように、上記カリ含有化合物またはリン酸含有化合物から1種以上を選び、この溶液にさらに溶解させて調整してもよい。

【0041】以上の成分を含む液体複合肥料は、例えば、100倍程度に希釈して使用すると、フザリウム菌の感染によって生じる植物病害において、土壌病原菌の個体群 (population) を減らすことができる。

【0042】また、リゾクトニア菌による植物病害に対しても効果を示す。さらに、上記の液体複合肥料は、葉面散布液としても使用することができる。窒素含量が1m²当たり1gとなるようにして、オフィオボラス菌によるオフィオボラスパッチ病の芝に葉面散布液として使用すると、病斑残存面積を減少させることができる。

【0043】さらに、上記液体複合肥料を水1Lに対して5～8mLを添加すると、水耕栽培用養液として使用することもできる。このような成分の養液を使用すると、ビシウム菌による植物病害の発生抑制するとともに、水

耕栽培している植物を健全に育成させることができる。

【0044】

【実施例】以下の実施例に基づいて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に何等限定されるものではない。

(実施例1) 耐熱性バチルススクリーニングおよび単離

(1) スクリーニング

発酵温度が70℃の発酵過程中的動物有機肥料を深さ30cmから採取した。これを殺菌水で10万倍程度に希釈した。内径8cmのシャーレにPDA培地15mLを入れて、平板培地を作製した。この平板培地に、コンラージ棒を用いて上記の希釈液を塗布し、55℃の恒温器中にて培養した。試験管内にPDA培地を入れて、別途、斜面培地を作製した。

【0045】(2) 単離

1週間後、上記の平板寒天上に現われたコロニーを(1)で作製した斜面培地に白金耳で移植し、この斜面培地を再び55℃で培養した。得られた菌の特性を調べ、バチルス・アマイロリケファセンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) と同定した。

【0046】(実施例2) 耐熱性バチルスの培養物および菌体含有液の調製

(1) 実施例1で得られたバチルスを、ニュートリエント培地中にて、35℃で3日間、本発明のバチルスを振とう培養し、4～5×10⁹cfu/mLの菌量の培養物を得た。

(2) この培養物50mLをとり、5,000rpmで10分間遠心して集菌した。この集菌した菌体に殺菌水50mLを加え、遠心操作を2回同様に行なって集菌した。集菌した菌体に殺菌水50mLを加えて、4～4.8×10⁹cfu/mLの菌量の耐熱性バチルス菌含有液を調製した。

【0047】(実施例3) 各種病原菌に対する拮抗力の検討

実施例2(1)および(2)で得た、本発明のバチルスの培養物およびバチルス含有液について、植物病原菌6種に対する拮抗力を調べた。上記2つの試料を、直径8mmのろ紙ディスクに0.2mL浸透させて、被験試料とした。拮抗力の検討には、PDA培地を入れたシャーレを使用した。阻止帯の形成のための培養は、25℃で行い、阻止帯の大きさの測定は培養10日目に行った。この阻止帯または阻止円の大きさによって、拮抗力を評価した。

【0048】ストレプトマイセス属以外の植物病原菌は、予めPDA培地で培養した。この培地ごと内径6mmのコルクボーラーで打ち抜き、これをシャーレの片方に植え付けた。シャーレのもう一方に、上記のろ紙ディスクを置いて、上記のように培養し、形成された阻止帯の大きさから植物病原菌への拮抗力を評価した。

【0049】ストレプトマイセス菌は、ジャガイモ煎汁培地で10日間培養した。得られた菌体を破碎し、シャーレ1枚当たり5mL入れて、培地表面上に前面塗布し

た。ここに上記のディスクを3枚置いて、上記のように培養し、形成された阻止帯の大きさから拮抗力を評価した。

*【0050】

【表2】

*

バチルス・アマイロリケファセンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)
の植物病原菌に対する拮抗力

供試植物病原菌	阻止帯または阻止円の大きさ(mm)	
	バチルス菌培養物	バチルス菌体含有液
フザリウム・オキシスポラム f. sp. ククメリナム	35.9	30.1
リゾクトニア・ソラニ	28.5	26.5
ピシウム・アフアニデルマタム	19.8	19.0
パーティシリウム・ダリアエ	28.8	24.1
オフィオボラス・グラミニス	31.4	30.8
ストレプトマイセス・スカビエス	20.5	19.2

【0051】表2に示したように、バチルス・アマイロリケファセンス菌体は、供試した植物病原菌に対して拮抗力を示し、バチルス培養物およびバチルス菌体含有液のいずれを用いた場合でも、大きな阻止帯または阻止帯が形成された。

【0052】(実施例4)液体複合肥料の調製
実施例1または2で得られたバチルス菌培養物または菌体含有液100重量部に、窒素肥料、カリ肥料およびリン酸肥料を表3に示す量で溶解させ、液体複合肥料-1～8を製造した。これら液体複合肥料中の硝酸態窒素含量、アンモニア態窒素含量、カリ含量、およびリン酸含量も表3に合わせて示した。

※【0053】これらの液体複合肥料は、以下のような植物病害抑制効果を示した。液体複合肥料-1～4は、フザリウム菌および/またはリゾクトニア菌による植物病害を抑制した。液体複合肥料-5および6は、ピシウム菌、パーティシリウム菌、オフィオボラス菌および/またはストレプトマイセス菌によって引き起こされる植物病害の発生を抑制した。液体複合肥料-7および8は、ピシウム菌、パーティシリウム菌、オフィオボラス菌および/またはストレプトマイセス菌によって引き起こされる植物病害の発生を抑制した。

【0054】

※【表3】

添加成分		液体複合肥料							
		1	2	3	4	5	6	7	8
添加量 (重量部)	菌培養物 菌体含有液	100 —	— 100	100 —	— 100	100 —	— 100	100 —	— 100
	硝酸カリウム 硝酸カルシウム	20 —	20 —	— 18	— 18	— —	— —	— —	— —
	リン酸アンモニウム 塩化アンモニウム	— —	— —	— —	— —	10 —	10 —	10 8	10 8
	硫酸カリウム 塩化カリウム	— —	— —	10 —	18 —	— 8	— 8	— —	— —
成分含量 (%)	硝酸態窒素含量(X)	2.5	2.5	3.0	3.0	—	—	—	—
	アンモニア態窒素含量(X)	—	—	—	—	2.0	2.0	4.0	4.0
	カリ含量(X)	9.0	9.0	5.0	5.0	2.0	2.0	—	—
	リン酸含量(X)	—	—	—	—	5.0	5.0	5.0	5.0

【0055】(実施例5)植物の病害の原因菌に対する菌体培養物、菌体含有液、および液体複合肥料の効果の検討-1

実施例1で得た菌体培養物、実施例2で得た菌体含有液、および実施例4で得た液体複合肥料-1および2を用いて、キュウリつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f.

sp. cucumerinum) に対する効果を調べた。

【0056】キュウリつる割病菌は分生胞子を作るため、これら分生胞子の土壌中における動態を指標とした。具体的には、γ線で滅菌した25mLのシリンジ(テルモ(株)製)に、20～35メッシュの殺菌海砂15gを詰め、 15×10^5 cfu/mLのキュウリつる割病菌の胞子懸濁液

10mLを流した。上記の菌体培養物、菌体含有液、液体複合肥料-1または2をそれぞれ供試液として100倍に希釈し、上記の各シリンジに各々10mLを流した。その後、25℃にて5日間培養した。

【0057】5日後に、各シリンジに5mLの殺菌水を流し、シリンジから流し出した水を集めて、この中に含ま*

土壌中のキュウリつる割病菌分生胞子の動態に及ぼす影響

供試材料	キュウリつる割病菌分生胞子数(cfu/mL)	標準偏差(n=3)	総菌落数	相対値*
殺菌水	62.3×10^4	6.2	187	100
バチルス培養物	1.3×10^4	0.5	4	2.1
バチルス菌体含有液	2.3×10^4	2.2	7	3.7
液体複合肥料	3.3×10^4	1.3	10	0.5

*：殺菌水を100とした場合の相対値

【0059】表4に示したように、上記の菌体培養物、菌体含有液、液体複合肥料-1または2を用いると、土壌中のキュウリつる割病菌の個体数が減少することが明らかになった。

【0060】（実施例6）植物の病害の原因菌に対する液体複合肥料の効果の検討-2

実施例4で得た液体複合肥料-1〜4を用いて、キュウリ苗立枯病の発生に対する効果を、以下のようにして調べた。インソイト（インソイト工業社製）4L、コメヌカ（米穀店で市販されているもの）1L、および水2Lを混合して300mLの広口三角フラスコに適量詰めて、12℃にて60分間殺菌した。冷却後、キュウリ苗立枯病を起こすリゾクトニア菌を植え付け、28℃にて3週間培養した。

【0061】洪積層土壌（N：P：K=0.013：0.031：0.056%、CEC4.7 me/100g）1L当たり、3週間培養したこの病原菌50gを混合して、汚染土壌を作製した。この汚染土壌1Lに対して液体複合肥料-1〜4の窒素含量が100mgとなるように、これらの液体複合肥料を添加してよく混合した。液体複合肥料-1〜4の窒素含量が100mgとなる量は、具体的には、液体複合肥料-1および2では汚染土壌1Lあたり4mL、液体複合肥料-3および4では汚染土壌1Lあたり3.3mLである。この混合物を、直径15cmの素焼の鉢に詰めた。1ポットにキュウリの種子を10粒ずつ播種して苗立枯病が発生する割合を調べ、発病率とした。

【0062】対照とする肥料には、グリーンホスカ（10-10-10）を用いて、上記の汚染土壌1Lに対する窒素含量が本発明の液体複合肥料-1〜4と同じになるように使用した。すなわち、グリーンホスカ1gを汚染土壌1Lに使用した。各区5ポットの3反復で実験を行った。結果を図1に示す。図1に示すように、本発明の液体複

*れるキュウリつる割病菌の菌数（海砂中から流し出された菌数）を、実施例1で記載したと同様にして、ローズベンガル加用マーティン（Martin）培地を分離用として、平板法にて調べた。結果を表4に示す。

【0058】

【表4】

合肥料-1〜4を使用した区では、いずれも苗立枯病の発生率が低かった。

【0063】（実施例7）植物の病害の原因菌に対する液体複合肥料の効果の検討-3

実施例4の液体複合肥料-5〜8を用いて、ゴルフ場のベントナーセリーで発生したオフィオボラスパッチ病（Take-All Patch：立枯病）に対する防除効果を試験した。このオフィオボラスパッチ病の病原菌は、オフィオボラス・グラミニス（*Ophiobolus graminis*）、すなわちガエマノマイセス・グラミニス（*Gaeumanomyces graminis*）である。

【0064】実験規模は、各区1m²、施用量は窒素含量が1g/m²とした。対照には、ダコグリーン（武田薬品工業社製）を用いた。本発明の液体複合肥料-5および6では50mL、液体複合肥料-7および8では25mLを水1000mLに添加してこれを如露で散布した。ダコグリーンは、500倍となるように水1000mLに添加して各区に如露で散布した。

【0065】防除効果は、以下のように評価した。試験区を予め写真撮影をし、スキャナーにかけて病斑面積を読み取った。本発明の液体複合肥料-5〜8および対照のダコグリーンを散布後、1ヶ月経過したときに各試験区を再度写真撮影した。これをキャナーにかけて病斑面積を読み取り、病斑面積の減少率を求め、これを下記式によって防除値を算出した。

防除値（%）=（1-本発明の液体複合肥料または対照を使用した区における病斑残存率/無施用区における病斑残存率）×100

結果を表5に示す。

【0066】

【表5】

オフィオボラスパッチ病に対する液体複合肥料の防除効果試験

供試材料	病斑減少面積	病斑残存面積	防除値 (%)
液体複合肥料	82	18	72.3
液体複合肥料	80	20	69.2
液体複合肥料	92	8	87.7
液体複合肥料	87	13	80.0
ダコグリーン	65	35	46.2
対 照 区	35	65	—

【0067】表5に示したように、本発明の液体複合肥料-5~8は、ベントグラスナーセリーで発生したオフィオボラスパッチ病に対して、対照であるダコグリーンよりも強い防除効果を示した。防除効果の高さは回復の目安となるため、本発明の液体複合肥料の方がダコグリーンより回復が早いことが示された。

【0068】（実施例8）植物の病害の原因菌に対する液体複合肥料の効果の検討-4

実施例4で得た本発明の液体複合肥料-7および8を用いて、ミツバの水耕栽培の際に発生する立枯病に対する防除効果と生育状態とを検討した。

【0069】（1）ミツバの種子の育苗

対照養液肥料は、水耕栽培農家で汎用されている標準培地溶液に準じて調製した。すなわち、水1m³（1トン）当たり、硝酸態窒素含量11%の硝酸石灰1kgを溶解させ、ここにくみあい苦土硼素マンガ入り水耕肥料1号（N:P:K=10:8:25、くみあい化学製）1.5kgを加えて完全に溶解させた養液肥料を用いた。

【0070】ミツバの種子を200倍のアンチホルミン（ナカライテスク社製）で10分間殺菌した後、水道水で15時間洗浄し、洗濯機で3分間脱水して5℃の冷室に15日間保存した。これらの種子を30×60cm（12×25=300ブロック）のウレタンフォーム上に、1ブロック当たり15粒の種子を播種して、20℃にて人工気象器内で10日間*

*育苗した。

【0071】（2）ミツバ苗の水耕栽培

養液を両側から液を循環できるプラスチックコンテナ（深さ6cm、幅52cm、長さ62cm）中に、40穴の植穴を有する発泡スチロール板（厚さ2.5cm、幅50cm、長さ60cm）を浮かせて、ここに上記の人工気象器内で育成したミツバ苗1ブロックを1穴に定植した。25℃の温室内で、ポンプで養液を循環させて栽培した。対照である標準培養液は、10Lの水に硝酸石灰10gとくみあい水耕肥料1号（くみあい化学（株）製）15gを加えて調製した。本発明の液体複合肥料を含む培養液は、10Lの水に上記液体複合肥料65mLを添加して調製した。

【0072】（3）供試病原菌および発病率の調査
ピシウム・アファニデルマタム（*Pythium aphanidermatum*）を用いた。皮をむいたジャガイモを約1cm角に切って殺菌し、この菌を植え付けて、30℃にて1週間培養した。この培養の後、ジャガイモ1切れに30mLの殺菌水を加え、ワーリングブレンダーを用いて低速で磨砕した。この磨砕液300mLを10Lの上記の養液中に添加した。定植後30日目に発病ブロック数を数えて立枯病の発病率を調査した。結果を表6に示す。

【0073】

【表6】

養液肥料が水耕ミツバの立枯病発生に及ぼす影響

供試養液	病原菌無接種区			病原菌接種区		
	定植 ブロック数	発病 ブロック数	発病率 (%)	定植 ブロック数	発病 ブロック数	発病率 (%)
標準培養液	40	0	0	40	18	45
液体複合肥料-1	40	0	0	40	2	5
液体複合肥料-2	40	0	0	40	5	12.5

液体複合肥料-1：バチルス菌培養物と液体肥料を含む

液体複合肥料-2：バチルス菌体含有液と液体複合肥料を含む

【0074】表6に示すように、病原菌無接種区では、いずれにおいても発病は認められなかった。一方、病原菌を接種した区では、立枯病の発病率が本発明の液体複合肥料を使用した場合において非常に低く、発病の著しい抑制効果が示された。

【0075】（4）生育状態

生育状態は、以下のようにして調査した。すなわち、定植後40日目に各供試区よりランダムに5ブロックを抜き取り、ウレタンフォーム上から根を切った。茎葉部の生体重（湿重（g））および乾重（g）を1ブロック当た

り4株についてそれぞれ計測し、各株当たりの重量を求め示す。

めた。乾重は生体重量を求めた株を100℃で8時間乾燥【0076】

し、各株当たりの重量を求めて調整した。結果を表7に＊【表7】

養液肥料が水耕ミツバの立枯病発生に及ぼす影響

供試養液	病原菌無接種区	
	生体重(g)/株	乾重(g)/株
標準培養液	3.087±0.629	0.232±0.060
液体複合肥料-1	3.982±0.851	0.304±0.063
液体複合肥料-2	3.874±0.777	0.308±0.078

液体複合肥料-1：バチルス菌培養物と液体肥料を含む
液体複合肥料-2：バチルス菌体含有液と液体複合肥料を含む
n=25

【0077】表7に示したように、本発明の液体複合肥料を添加した養液で栽培したミツバは、生体重および乾重ともに対照の肥料を添加した標準培養液で栽培した場合よりも重く、生育が促進されていることが示され、収量が増加することが示された。なお、ミツバの組織内に本発明のバチルス菌が入るか否かを組織培養法によって調べた。その結果、ミツバの組織体内には入らないことが明らかになった。

【0078】

【発明の効果】本発明によれば、耐熱性のバチルスが提供され、このバチルス菌の培養物または菌体含有液を含※

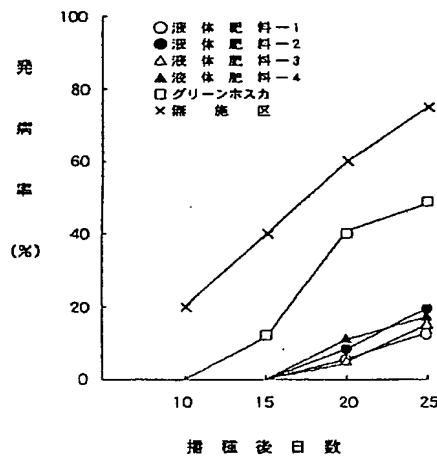
※む液体複合肥料が提供される。この液体複合肥料は、土壌中の植物病原菌の個体数を減少させることができるとともに、植物病害の発生を抑制し、さらに、植物体を健全に育成して収量を増加させることができる。また、本発明の液体複合肥料は、農作物および園芸作物の土壌栽培、水耕栽培、礫栽培など、あらゆる栽培に利用することができる。さらに、葉面散布肥料としても利用することができ。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の液体複合肥料を施用した場合のキュウリ苗立枯病の発病率の経時変化を示す図である。

【図1】



液体複合肥料施用がキュウリ苗立枯病 (Rhizoctonia)の発病に及ぼす影響

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C05G 1/00
3/02

識別記号

F I

C05G 1/00
3/02

A

5/00
//(C 1 2 N 1/20
C 1 2 R 1:07)

5/00 A